

JP06277067A

MicroPatent Report**GENE DNA CODING ACETOHYDROXY ACID  
ISOMEROREDUCTASE**

[71] **Applicant:** MITSUBISHI  
PETROCHEM CO LTD

[72] **Inventors:** INUI MASAYUKI;  
KOBAYASHI MIKI;  
YUGAWA HIDEAKI

[21] **Application No.:** JP05068153

[22] **Filed:** 19930326

[43] **Published:** 19941004

[No drawing]

[Go to Fulltext](#)

[57] **Abstract:**

**PURPOSE:** To produce L-isoleucine or L-valine in high efficiency by using a gene originated from coryneform bacteria and coding acetohydroxy acid isomeroreductase.  
**CONSTITUTION:** A gene coding acetohydroxy acid isomeroreductase and consisting of 1014 base pairs coding 338 amino acids is separated from *Brevibacterium flavum* MJ-233 and introduced into the same kind of coryneform bacteria. L- isoleucine or L- valine can be produced in high efficiency from a new viewpoint by using the transformed coryneform bacteria.

[51] **Int'l Class:** C12N01553 C12N00121 C12N00904 C12N01553  
C12R00113 C12N00121 C12R00113

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277067

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	片内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 15/53	ZNA			
1/21		7236-4B		
9/04	Z	9359-4B		
//(C12N 15/53		9050-4B	C12N 15/00	A
		審査請求 未請求	請求項の数7	OL (全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-68153

(22)出願日 平成5年(1993)3月26日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 乾 将行

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を用い、効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造する。

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233から単離された、338個のアミノ酸をコードする1014の塩基対より成るアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアセヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

ATGGCTATTG AACTGCTTTA TGATGCTGAC GCTGACCTCT CCTTGATCCA GGGCOGTAAG 60
GTTGCCATCG TTGGCTACGG CTCCCAGGGC CACGCACACT CCCAGAACCT CCGCGATTCT 120
GGCGTTGAGG TTGTCAATTG TCTGCCGAG GGTCCAAGT CCGCAGAGAA GGCAAAGGAA 180
GCAGGCTTCG AAGTCAAGAC CACCGCTGAG GCTGCAGCTT GGGCTGACGT CATCATGCTC 240
CTGGCTCCAG ACACTCCCA GGCAGAAATC TTCACCAACG ACATCGAGCC AAACCTGAAC 300
GCAGGCGACG CACTGCTGTT CGGCCACGGC CTGAACATTC ACTTCGACCT GATCAAGCCA 360
GCTGACGACA TCATCGTTGG CATGTTTGG CCAAAGGGCC CAGGCCACTT GGTTCGCCGT 420
CAGTTCTGTT ATGGCAAGGG TGTTCCTTGC CTCATCGCAG TCGACCAGGA CCCAACCGGA 480
ACCGCACAGG CTCTGACCTT GTCTACGCA GCAGCAATCG GTGGCGCAG CGCAGGCGTT 540
ATCCCAACCA CCTTCGAAGC TGAGACCGTC ACGACCTCT TCGCGCAGCA GGCTGTTCTC 600
TGCGGTGGCA CCGAGGAAT GGTCAAGGTT GGCTTCGAGG TTCTACCGA AGCTGGCTAC 660
GAGCCAGAGA TGGCATACTT CGAGGTTCTT CACGAGCTCA AGCTCATCGT TGACCTCATG 720
TTCGAAGGTG GCATCAGCAA CATGAATAC TGTGTTCTG ACACCGCTGA GTTCGGTGGC 780
TACCTCTCCG GCGCACGGT CATCGATGCA GACACCAAGT CCGCATGAA GGACATCTG 840
ACCGATATCC AGGACGGCAC CTTACCAAG CGCTCATCG CAAACGTTGA GAACGGCAAC 900
ACCGAGCTTG AGGGTCTTCG TGCTTCTAC AACCAACCACC CAATCGAGGA GACCGGCGCT 960
AAGCTCCGCG ACCTCATGAG CTGGGTCAAG GTTGACGCTC GCGCAGAAAC CGCTTAA 1017

```

で表されるアセヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Met Ala Ile Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile
  1           5           10          15
Gln Gly Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala
  20          25          30
His Ser Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Ile Gly Leu
  35          40          45
Arg Glu Gly Ser Lys Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ala Gly Phe Glu
  50          55          60
Val Lys Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Trp Ala Asp Val Ile Met Leu
  65          70          75          80
Leu Ala Pro Asp Thr Ser Gln Ala Glu Ile Phe Thr Asn Asp Ile Glu
  85          90          95
Pro Asn Leu Asn Ala Gly Asp Ala Leu Leu Phe Gly His Gly Leu Asn
 100         105         110
Ile His Phe Asp Leu Ile Lys Pro Ala Asp Asp Ile Ile Val Gly Met
 115         120         125
Val Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp
 130         135         140
Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Ile Ala Val Asp Gln Asp Pro Thr Gly
 145         150         155         160
Thr Ala Gln Ala Leu Thr Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Ile Gly Gly Ala
 165         170         175
Arg Ala Gly Val Ile Pro Thr Thr Phe Glu Ala Glu Thr Val Thr Asp
 180         185         190
Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Glu Glu Leu Val
 195         200         205
Lys Val Gly Phe Glu Val Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Glu Pro Glu Met

```

210	215	220
Ala Tyr Phe Glu Val Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met		
225	230	235
Phe Glu Gly Gly Ile Ser Asn Met Asn Tyr Ser Val Ser Asp Thr Ala		240
	245	250
Glu Phe Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Pro Arg Val Ile Asp Ala Asp Thr		255
	260	265
Lys Ser Arg Met Lys Asp Ile Leu Thr Asp Ile Gln Asp Gly Thr Phe		270
	275	280
Thr Lys Arg Leu Ile Ala Asn Val Glu Asn Gly Asn Thr Glu Leu Glu		285
	290	295
Gly Leu Arg Ala Ser Tyr Asn Asn His Pro Ile Glu Glu Thr Gly Ala		300
305	310	315
Lys Leu Arg Asp Leu Met Ser Trp Val Lys Val Asp Ala Arg Ala Glu		320
	325	330
		335
Thr Ala		

で表されるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(E. C. 1. 1. 1. 86)をコードする遺伝子DNA、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌に関する。

【0002】

【従来の技術】 アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(E. C. 1. 1. 1. 86)は、イソロイシン及びバリンの生合成遺伝子の一つとして、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)においてよく研究されており【ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry) 261, 2441-2450, 1986】、その他にも、シネコシスティス(*Synechocystis* sp.)由来遺伝子【ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology) 174, 7910-7918, 1992】、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)由来遺伝子【ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology) 174, 6580-6589, 1992】、リゾビウム・メリロティー(*Rhizobium meliloti*)由来遺伝子【ジ

ャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology) 173, 7756-7764, 1991】、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)由来遺伝子【ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acid Research) 14, 9631-9651, 1986】、スピナチア・オレラセア(*Spinacia oleracea*)由来遺伝子【バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal) 277, 496-475, 1991】の一次構造が決定されている。。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(E. C. 1. 1. 1. 86)遺伝子の一次構造について、従来の報告例はない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ(E. C. 1. 1. 1. 86)をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。かくして、本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、が提供される。

【0005】 以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「アセトヒドロキシ酸イソメロレダクター

ぜをコードする遺伝子DNA」とは2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸から2, 3-ジヒドロキシ-3-メチル吉草酸を合成する酵素、あるいは、2-アセト乳酸から2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸を合成する酵素、すなわちアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ (E. C. 1. 1. 86) をコードする遺伝子DNAを意味する。

【0006】アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0007】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0008】まず、プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばBgl II 及びEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片を平滑末端処理後、大腸菌における発現ベクター、例えばpKK233-3 (ファルマシア製) に挿入し、このベクターを用いてアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ遺伝子が欠損したイソロイシン

及びバリン要求性大腸菌変異株エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) ME8315 [国立遺伝学研究所、遺伝実験生物保存研究センター; 〒411、静岡県三島市谷田1111番地] を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0009】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記イソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素Bgl II で切断することによって得られる大きさが約2.1 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0011】この約2.1 kbのアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0012】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)		
PvuII	1	1.55	0.55	
SaII	2	0.95	0.65	0.5
EcoRV	1	1.1	1.0	
StuI	1	1.8	0.3	
DraI	1	1.4	0.7	

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上で

の泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$  x 174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる

結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記したブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、BglIIによって切断することにより得られる大きさが約2.1 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118及び/またはpUC119（宝酒造製）を用いるジデオキシヌクレオチド終断法（dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977）により決定することができる。このようにして決定した上記約2.1 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子は、後記する配列表の配列番号：1に示す配列を有するものであり、338個のアミノ酸をコードする1014塩基対から構成されている。

【0016】上記した、後記配列表の配列番号：1に示す塩基配列を包含して成る本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ社製394 DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成されたものであってもよい。

【0017】また、前記の如くブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0018】以上に詳述した大きさが約2.1 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身

のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレヴィバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「複製領域」と言うことがある。）を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「安定化領域」と言うことがある。）を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNA

リガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約2.1 kbのA断片を導入した組換えプラスミドを、本発明者らはプラスミドpCRY30-IRと命名した。プラスミドpCRY30-IRの作成方法の詳細については、後記実施例で説明する。

【0025】かくして造成されるアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-イソロイシン及びL-バリンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-A B-41 (FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール質性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;ブレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020;ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869;コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いる

こともできる。

【0028】なお、宿主としてブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である (Bact. Rev., 36, p. 361~405 (1972) 参照)。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0030】上記宿主微生物の前記組換えプラスミドによる形質転換は、それ自体既知の方法、例えばCalvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 等の文献に記載の方法により、例えば宿主微生物にパルス波を通電 (Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照) することにより行うことができる。

【0031】上記の方法で形質転換して得られるアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキ

ス、酵母エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養源を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とすることができ、最高期間は3日間である。

【0033】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-イソロイシン又はL-バリン生成反応に使用することができる。L-イソロイシン又はL-バリン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0034】しかし本発明に従えば、上記培養菌体又は菌体処理物の存在下に、少くとも炭素源と窒素源を含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシン又はL-バリンの製造法が提供される。上記の酵素反応は、通常約20～約40℃、好ましくは約25～約35℃の範囲内で行うことができる。

【0035】水性反応液中に添加することができる炭素源、窒素源は、前記した通常の栄養培地に用いられるものを挙げることができる。また該水性反応液には、前記した通常の栄養培地に用いることができる無機塩等を添加することもできる。特に、本発明のプラスミドで形質転換しうる宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくとも炭素源と窒素源とを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系において炭素源及び窒素源がエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-イソロイシン又はL-バリンが製造される。

【0036】しかし本発明に従えば、(1)上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少くともエタノールと酪酸誘導体をビオチンを含有しない水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシンの製造法、(2)上記培養

菌体又はその固定化物の存在下に、少くともグルコースを含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-バリンの製造法が提供される。

【0037】上記した、本発明に従う水性反応液は、ビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリス塩酸等の緩衝液であることもできるが、好ましくはビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンステイープリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び/又は無機物を含有する水溶液が包含される。本発明において用いる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また、無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独でまたは2種以上混合して用いることができる。

【0038】本発明に従うL-イソロイシン又はL-バリンの製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g/l； $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l； $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ppm； $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  20ppm含有するpH7.6の水溶液。

【0039】本発明のL-イソロイシン又はL-バリン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (wt/vol)、好ましくは2～20% (wt/vol)の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0040】本発明に従うL-イソロイシンの製造法においては、上記したビオチンを含有しない水性反応液中にて、エタノールと酪酸誘導体と窒素源とが酵素反応せしめられL-イソロイシンが生成される。

【0041】L-イソロイシン製造に際しての、水性反応液中のエタノールの濃度は通常0.5～40容量%、好ましくは1～20容量%の範囲内とすることができる。水性反応液中の酪酸誘導体としては、例えば、DL- $\alpha$ -アミノ酪酸、 $\alpha$ -ケト酪酸又はそれらの塩類を挙げることができる。水性反応液中の酪酸誘導体の濃度は、通常0.1～20% (wt/vol)の濃度範囲で使用するのが適当であるが、特に $\alpha$ -ケト酪酸又はその塩を使用する場合は、反応液中の濃度が常に0.3% (wt/vol)を越えずに添加すると、副生物である



ノルバリンの生成を低減し、L-イソロイシンの収率も向上させることができる。上記した反応基質の添加は、上記濃度を越えないかぎり連続的に行ってもよく、あるいは間欠的に行ってもよい。反応に使用される上記した酪酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩類；カルシウム等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム塩等が挙げられ、それらの中でもナトリウム塩が好適である。

【0042】また、本発明に従うL-バリンの製造法においては、上記したビオチンを含む水性反応液中にて、グルコースと窒素源とが酵素反応せしめられL-バリンが生成される。L-バリン製造に際しての、水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1~5.0重量%の範囲内とすることができる。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。

【0043】かくして製造されるL-イソロイシン又はL-バリンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行うことができる。

【0044】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローン化

【0045】(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000×g、20分間、10~12℃)し、上清画分を分取し、

酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

#### 【0046】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI及びBglII 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI及びBglII分解DNAに平滑末端処理後、クローニングベクターpKK223-3(ファルマシアより市販)を制限酵素EcoRIで切断し平滑末端処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及び $\text{T}_4$  DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

#### 【0047】(C) アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選択は、前記大腸菌変異株エシェリヒア・コリME8315を用いて行った。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリME8315を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解)に塗抹した。

【0048】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpKK223-3の長さ4.6kbのDNA断片に加え、長さ約2.1kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約2.1kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0049】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0050】

【表2】

表2 プラスミドpKK223-1R

制限酵素	認識部位数	切断片の大きさ (kb)
Sal I	4	4.05 1.2 0.95 0.5
Pvu II	2	4.2 2.5
EcoRV	1	6.7

【0051】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpKK223-1Rと命名した。以上によりアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.1 kbのDNA断片 (Bg1 II-EcoRI断片) を得ることができた。

#### 【0052】実施例2

アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含む長さ約2.1 kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118及びpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法) (Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0053】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を有する338個のアミノ酸をコードする1014の塩基対より構成されていた。

#### 【0054】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

##### (A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (VERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0055】半合成培地A培地 [尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 6mg、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1リットル] 1リットルに、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液 [25mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース] 20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液 [0.2N NaOH、1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、こ

の反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液] 30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0056】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0057】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 (トリス10mM、EDTA 1mM; HClにてpH8.0に調製) 2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液] 15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0058】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

##### 【0059】

##### (B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造製) 0.5μgに制限酵素Sal I (5 units) を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素Xho I (1 unit) を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0060】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及

びT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル（宝酒造製）を形質転換した。

【0061】形質転換株は30 μg/ml（最終濃度）のカナマイシン、100 μg/ml（最終濃度）のIPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）100 μg/ml（最終濃度）のX-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド）を含むL培地（トリプトン10 g、酵母エキス5 g、NaCl 5 g及び蒸留水1リットル、pH 7.2）で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p 90~91参照] により抽出した。

【0062】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0 kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503 DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1 kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

#### 【0063】実施例4

プラスミドpCRY-IRの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpKK223-IR 5 μgを制限酵素BamHIを5 units用い、37℃で1時間反応させ分解し、平滑末端処理したものと、EcoRIリンカー（宝酒造より市販）1 μlを混合し、50 mMトリス緩衝液（pH 7.6）、10 mMジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub> およびT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0064】このDNAを制限酵素EcoRI 3 unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1 μgを制限酵素EcoRI 1 unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50 mMトリス緩衝液（pH 7.6）、10 mMジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub> およびT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記エシェリヒア・コリME8315株を形質転換し、カナマイシン50 μg/mlを含む選択培地 [K<sub>2</sub> HP O<sub>4</sub> 7 g、KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g、グルコース20 g、ロイシン20 mg、チアミン1 mg及び寒天16 gを蒸留水1リットルに溶解] に塗抹した。

【0065】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6 kbのDNA断片に加え、大きさ2.4 kb [2.1 kb; アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼを含む断片、0.3 kb; tacプロモーター (pKK223-3由来)] を含む断片の挿入DNA断片が認められた。

【0066】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY502除去株を100 mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20 mlのバルス用溶液 (2.72 mM Sucrose、7 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5 mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75 mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンバルサー (バイオラッド社製) を用いて、2500ボルト、25 μFDに設定し、パルスを加後水中に20分間静置した。全量を3 mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0067】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-IR

制限酵素	認識部位数	切断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6, 2.4
KpnI	1	11.0
BamHI	1	11.0

Sma I	2	6. 2, 4. 8
Sac I	2	8. 4, 2. 6
Xho I	1	11. 0

【0068】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-IRと命名した。このプラスミドpCRY30-IRの制限酵素切断点地図を図3に示す。なお、プラスミドpCRY30-IRにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-IRは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号：FERM P-13509として寄託されている。

#### 【0069】実施例5

プラスミドpCRY30-IRの安定性  
前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレバクテリウム・フラバムMJ233-IRを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントし

た。

【0070】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

#### 【0071】

##### 【配列表】

配列番号：1  
配列の長さ：1017  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：Genomic DNA  
起源  
生物名：プレバクテリウム フラバム  
菌株名：MJ233  
配列の特徴  
特徴を表す記号：peptide  
存在位置：1-1017  
特徴を決定した方法：E

#### 【0072】

##### 配列

```

ATG GCT ATT GAA CTG CTT TAT GAT GCT GAC GCT GAC CTC TCC TTG ATC 48
Met Ala Ile Glu Leu Tyr Asp Ala Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile
1 5 10 15
CAG GGC CGT AAG GTT GCC ATC GTT GGC TAC GGC TCC CAG GGC CAC GCA 96
Gln Gly Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala
20 25 30
CAC TCC CAG AAC CTC CGC GAT TCT GGC GTT GAG GTT GTC ATT GGT CTG 144
His Ser Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Ile Gly Leu
35 40 45
CGC GAG GGC TCC AAG TCC GCA GAG AAG GCA AAG GAA GCA GGC TTC GAA 192
Arg Glu Gly Ser Lys Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ala Gly Phe Glu
50 55 60
GTC AAG ACC ACC GCT GAG GCT GCA GCT TGG GCT GAC GTC ATC ATG CTC 240
Val Lys Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Trp Ala Asp Val Ile Met Leu
65 70 75 80
CTG GCT CCA GAC ACC TCC CAG GCA GAA ATC TTC ACC AAC GAC ATC GAG 288
Leu Ala Pro Asp Thr Ser Gln Ala Glu Ile Phe Thr Asn Asp Ile Glu
85 90 95
CCA AAC CTG AAC GCA GGC GAC GCA CTG CTG TTC GGC CAC GGC CTG AAC 336
Pro Asn Leu Asn Ala Gly Asp Ala Leu Leu Phe Gly His Gly Leu Asn
100 105 110
ATT CAC TTC GAC CTG ATC AAG CCA GCT GAC GAC ATC ATC GTT GGC ATG 384
Ile His Phe Asp Leu Ile Lys Pro Ala Asp Asp Ile Ile Val Gly Met
115 120 125

```

GTT GCG CCA AAG GGC CCA GGC CAC TTG GTT CGC CGT CAG TTC GTT GAT 432  
 Val Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp  
 130 135 140  
 GGC AAG GGT GTT CCT TGC CTC ATC GCA GTC GAC CAG GAC CCA ACC GGA 480  
 Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Ile Ala Val Asp Gln Asp Pro Thr Gly  
 145 150 155 160  
 ACC GCA CAG GCT CTG ACC CTG TCC TAC GCA GCA GCA ATC GGT GGC GCA 528  
 Thr Ala Gln Ala Leu Thr Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Ile Gly Gly Ala  
 165 170 175  
 CGC GCA GGC GTT ATC CCA ACC ACC TTC GAA GCT GAG ACC GTC ACC GAC 576  
 Arg Ala Gly Val Ile Pro Thr Thr Phe Glu Ala Glu Thr Val Thr Asp  
 180 185 190  
 CTC TTC GGC GAG CAG GCT GTT CTC TGC GGT GGC ACC GAG GAA CTG GTC 624  
 Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Glu Glu Leu Val  
 195 200 205  
 AAG GTT GGC TTC GAG GTT CTC ACC GAA GCT GGC TAC GAG CCA GAG ATG 672  
 Lys Val Gly Phe Glu Val Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Glu Pro Glu Met  
 210 215 220  
 GCA TAC TTC GAG GTT CTT CAC GAG CTC AAG CTC ATC GTT GAC CTC ATG 720  
 Ala Tyr Phe Glu Val Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met  
 225 230 235 240  
 TTC GAA GGT GGC ATC AGC AAC ATG AAC TAC TCT GTT TCT GAC ACC GCT 768  
 Phe Glu Gly Gly Ile Ser Asn Met Asn Tyr Ser Val Ser Asp Thr Ala  
 245 250 255  
 GAG TTC GGT GGC TAC CTC TCC GGC CCA CGC GTC ATC GAT GCA GAC ACC 816  
 Glu Phe Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Pro Arg Val Ile Asp Ala Asp Thr  
 260 265 270  
 AAG TCC CGC ATG AAG GAC ATC CTG ACC GAT ATC CAG GAC GGC ACC TTC 864  
 Lys Ser Arg Met Lys Asp Ile Leu Thr Asp Ile Gln Asp Gly Thr Phe  
 275 280 285  
 ACC AAG CGC CTC ATC GCA AAC GTT GAG AAC GGC AAC ACC GAG CTT GAG 912  
 Thr Lys Arg Leu Ile Ala Asn Val Glu Asn Gly Asn Thr Glu Leu Glu  
 290 295 300  
 GGT CTT CGT GCT TCC TAC AAC AAC CAC CCA ATC GAG GAG ACC GGC GCT 960  
 Gly Leu Arg Ala Ser Tyr Asn Asn His Pro Ile Glu Glu Thr Gly Ala  
 305 310 315 320  
 AAG CTC CGC GAC CTC ATG AGC TGG GTC AAG GTT GAC GCT CGC GCA GAA 1008  
 Lys Leu Arg Asp Leu Met Ser Trp Val Lys Val Asp Ala Arg Ala Glu  
 325 330 335  
 ACC GCT TAA 1017  
 Thr Ala

【図面の簡単な説明】

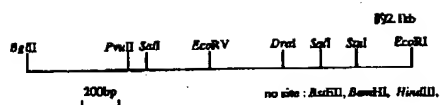
【図1】本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダク  
 ーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.1 kbの  
 DNA断片の制限酵素切断点地図。

【図2】大きさが約2.1 kbの本発明のDNA断片の  
 塩基配列決定のための戦略図。

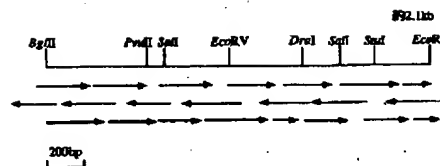
【図3】本発明のプラスミドpCRY30-IRの制限  
 酵素切断点地図。

Best Available Copy

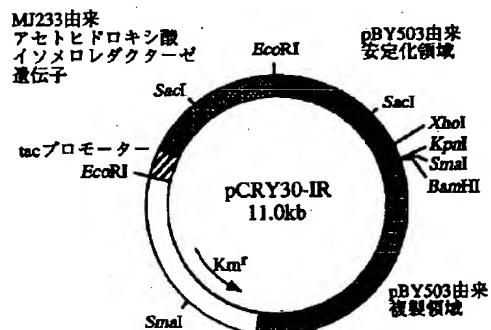
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup> \_\_\_\_\_ 識別記号 \_\_\_\_\_ 庁内整理番号 \_\_\_\_\_ F. I. \_\_\_\_\_

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)  
(C 1 2 N 1/21  
C 1 2 R 1:13)

Best Available Copy

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277073

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/77	Z N A	7236-4B		
1/21				
15/31				
// (C 1 2 N 15/77		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求	請求項の数 8	O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-71767

(22)出願日 平成5年(1993)3月30日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 浅井 陽子

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 曾我 道照 (外6名)

(54)【発明の名称】 蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からセックイー(secE)遺伝子DNAを単離し、該遺伝子の塩基配列を決定すると共に、該遺伝子を含むDNAを有するコリネ型細菌内で安定なプラスミドpCRY30-secEを構築した。

【効果】 該プラスミドを用いて形質転換されたコリネ型細菌を用いることで、従来よりも高効率に有用微生物産物を生産することが可能である。

Best Available Copy

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする、遺伝子DNA。

【請求項2】 前記コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 であ

GTGGGAGAAG TCCGTAAGGT TATTTGGCCT ACTGCGCGCC AGATGGTCAC GTACACCCCTT 60  
GTGGTTTTGG GATTTTTGAT TGTTTTGACC GCTTTGGTGT CTGGTGTGGA TTCTCTAGCT 120  
GGTCTTGGAG TTGAGAAGAT TCTGACTCCG TAG 153

【請求項5】 下記アミノ酸配列を含む蛋白質をコード する、請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNA：

Val Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val Thr Tyr  
1 5 10 15  
Thr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Val Ser Gly Val  
20 25 30 35  
Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys Ile Leu Thr Pro  
40 45 50

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAを導入した、組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子DNAおよびコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する、請求項6に記載の組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項6または7に記載の組換えプラスミドを保有する、コリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションに関与する遺伝子DNA、特に蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNAに関する。さらに詳しくは、蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子群の中でも重要な遺伝子の一つであるセックイー (secE) 遺伝子に関する。ここで、トランスロケーションマシナリーとは、膜蛋白質および分泌蛋白質各々が細胞膜に組み込まれる過程、あるいは菌体外に分泌される過程において必要不可欠な蛋白質群であり、本発明に言う「蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA」は、蛋白質のトランスロケーションマシナリーを構成する蛋白質をコードする遺伝子DNAを意味する。以上の如く、secE 遺伝子は蛋白質のトランスロケーションが行われる過程において重要な遺伝子の一つであり、さらには必要不可欠な遺伝子であると報告されている (薬学雑誌, 112, (6), 349, 1992)。従って、該遺伝子を高度に発現させることにより蛋白質のトランスロケーション効率が向上し、例えば有用な膜蛋白質および分泌蛋白質等の量的増加が図れるものと期待される。

【0002】

【従来の技術】 蛋白質のトランスロケーション機構については、主としてエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を材料として研究が進められており [Annual Review

Genetics, 24, 215-248, 1990; Annual Review of Biochemistry, 60, 101-124, 1991]、蛋白質のトランスロケーションに関与する遺伝子として、secA [Journal of Bacteriology, 150, 686-691, 1982]、secB [Journal of Bacteriology, 154, 254-260, 1983]、secD [Journal of Bacteriology, 169, 1286-1290, 1987]、secE [Genetics, 118, 571-579, 1988]、secF [EMBO Journal, 9, 3209-3216, 1990]、secY [Nucleic Acids Research, 11, 2599-2616, 1983] 等が報告されている。また、エシエリヒア・コリの各種変異株を用いた研究により、これら遺伝子群の中でもsecA、EおよびY遺伝子が蛋白質のトランスロケーションにおいて特に重要な役割を演じていることが示されている。現在のところ、secE 遺伝子についてはエシエリヒア・コリ由来の遺伝子 [Genetics, 118, 571-579, 1988 参照]、およびバチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来の遺伝子 [日本農芸化学会誌, 67(02), p137, 1993 参照] の単離は報告されているものの、産業上極めて重要な細菌であるコリネ型細菌由来のsecE 遺伝子については報告されていない。

【請求項3】 セックイー (secE) 遺伝子を含む、請求項1に記載の遺伝子DNA。

【請求項4】 下記塩基配列で示される、請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子DNA：

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 トランスロケーションマシナリーの利用例の1つとして、例えばコリネ型細菌を用いた分泌型蛋白質の生産が挙げられる。しかしながら、コリネ型細菌由来のトランスロケーションマシナリーについての知見が少ないこと、および他種に由来するトランスロケーションマシナリーはコリネ型細菌中で十分に機能しないことが示唆されていることから [Molecular Microbiology, 4, 305-314, 1990; FEBS Letters, 273, 75-78, 1990 参照]、実際に工業的生産において利用することは不可能であった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、トランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA群に属するsec

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、トランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA群に属するsec



cE遺伝子DNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。かくして本発明によれば、(1) コリネ型細菌に由来し蛋白質のトランスロケーションマシナリーをコードする遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド、及び(3) 該組換えプラスミドを保有するコリネ型細菌、が提供される。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0005】蛋白質のトランスロケーションマシナリーを構成する蛋白質群をコードする遺伝子DNA群の一つであるsecE遺伝子DNAを含むDNA断片(以下これを「A断片」と略称することがある)を、コリネ型細菌から調製する基本操作の一例を以下に述べる: secE遺伝子DNAを含むDNA断片(A断片)は、上記コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在するので、該菌株の染色体を適当な制限酵素で切断して生じる切断断片の中から分離取得することができる。

【0006】具体的には、先ずプレバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から常法により染色体DNAを抽出する。次いで、得られた染色体DNAを適当

な制限酵素、例えばEcoRIを用いて完全分解する。生じたDNA断片をクローニングベクター、例えばpUC118(宝酒造社製)に挿入し、該組換えベクターにより適当な宿主菌、例えばエシェリヒア・コリJM109(宝酒造社製)を形質転換する。この形質転換体を培養した後、プラスミドDNAを抽出する。エシェリヒア・コリおよびバチルス・サブチルスにそれぞれ由来するsecE遺伝子に共通な領域のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを用いて、得られたプラスミドDNAからプレバクテリウム・フラバムMJ-233染色体に由来する挿入A断片を確認し、取得することができる。このようにして得られるA断片の一つとして、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIにより完全分解して得られる大きさ約0.6 kbのDNA断片が挙げられる。この大きさ約0.6 kbのsecE遺伝子DNAを含むDNA断片を各種制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0007】

【表1】

第1表

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
<u>Nsp</u> (7524) V	1	0.15, 0.45
<u>Nae</u> I	1	0.25, 0.35
<u>Pvu</u> II	1	0.55, 0.05

【0008】なお、本明細書においては、DNA断片又はプラスミドを制限酵素により完全分解して得られた断片をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、これにより分離された断片数を制限酵素による「認識部位数」とした。また、「切断断片の大きさ」およびプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ( $\lambda$  phage)のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片を試料に用いたと同一のアガロースゲルで泳動して得られる標準線に基づき、またはポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ( $\phi$ x174 phage)のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片を試料に用いたと同一ポリアクリルアミドゲルで泳動して得られる標準線に基づき、それぞれ切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出した。プラスミドの大きさは各切断断片の大きさを加算して求めた。なお、各DNA

断片の大きさを決定するさいに、大きさ1 kb以上の断片については1%アガロースゲル電気泳動による値を採用し、大きさ1 kb未満の断片については5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動による値を採用した。

【0009】一方、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233染色体DNAを制限酵素EcoRIで切断して得られる大きさ約0.6 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造社製)を用いたジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法; Sanger, F.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977 参照)により決定した。該方法を用いて決定した上記DNA断片の塩基配列中に存在するオープンリーディングフレームを基にsecE遺伝子DNAの塩基配列を決定したところ、該遺伝子DNAは後記配列表の配列番号1に示す配列を有し、50個のアミノ酸をコードする150塩基対から構成されていた。上記塩基配列を包含する本発明のA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたDNAのみならず、通常用いられるDNA合

成装置、例えばベクマン社製システム1ープラス (System-1 Plus) を用いて合成したDNAであってもよい。また、上記手順によりプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得され、かつ蛋白質のトランスロケーションに関与する本発明の遺伝子DNAは、*secE* 遺伝子産物の機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく、または削除されていてもよく、あるいは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが本発明の遺伝子DNAに含まれるものである。

【0010】本発明のA断片は、例えばエシェリヒア・コリ内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入し、該ベクターを用いて *secE* 遺伝子低温感受性変異菌株であるために20℃では生育不可能なエシェリヒア・コリPS163株 [EMBO Journal, 10 (No7), 1749-1757, 1991] を形質転換し、20℃培養における該菌株の生育を可能とする等の機能を有する。また本発明のA断片を、適当なプラスミド、例えばコリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内で *secE* 遺伝子産物を高発現することが可能な組換えプラスミドを得ることができる。本発明で得られた *secE* 遺伝子を発現させるためのプロモーターとしては、例えばコリネ型細菌の保有するプロモーターを挙げることができるが、それに限られるものではなく、コリネ型細菌内で機能し、*secE* 遺伝子の転写を開始させ得る塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0011】本発明のA断片を導入することが可能であり、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2およびpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611およびpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4およびpCG11等を挙げることができる。コリネ型細菌の宿主ーベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とを共に有するベクターが特に好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、

pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KEおよびpCRY3KX等が好適に使用される。

【0012】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する手順を以下に示す。まず、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IF012144 (FERMBP-2515) からプラスミドpBY503 (特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出する。次に、抽出されたDNAの一部を制限酵素XhoIで切断してプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含む大きさ約4.0 kbのDNA断片 (複製機能領域) を切り出し、また、抽出DNAの残余を制限酵素EcoRIおよびKpnIで切断してプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含む大きさ約2.1 kbのDNA断片 (安定化機能領域) をも切り出す。そして、これらの断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造社製) のEcoRI-KpnI部位及びSalI部位に常法により組み込むことで、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0013】本発明のA断片を上記に例示したプラスミドベクターに導入するには、例えば該プラスミドベクター中に認識部位を1カ所だけ有する制限酵素を用いて該プラスミドベクターを開裂させ、次に必要に応じて前記A断片および開裂したプラスミドベクターをS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするかまたは適当なアダプターDNAを添加した後、DNAリガーゼ処理により両者を連結させればよい。本発明のA断片をプラスミドpCRY30に導入するには、まずプラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIにより処理して1カ所で開裂させ、そこに前記*secE* 遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させればよい。このようにして造成されたプラスミドpCRY30に本発明の大きさ約0.6 kbのA断片を導入した組換えプラスミドを、pCRY30-*secE* と命名した。プラスミドpCRY30-*secE* の作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0014】本発明によるプラスミドで形質転換し得る宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERMBP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERMBP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERMBP-1499)、およびプレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERMBP-1500) 等が挙げられる。なお、上記のFERMBP-1498~1500株は全てFERMBP-1497を親株としており、FERMBP-1498株はDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性株 (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)、FERMBP-1499株はD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株 (特開昭61-17799号公報参照)、およびFERMBP-1500株はL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株 (特開昭62-5198号公報参照) である。上記微生物の他に、プレバ

クテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同 ATCC13745、同 ATCC13746; プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020; プレバクテリウム・ラクトファーマンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831 等を宿主微生物として用いることもできる。

【0015】なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、該菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のために形質転換が困難となる場合があるので、そのような場合には、該菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。プラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。宿主プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度、例えば0.2~50 µg/mlのアクリジンオレンジもしくはエチジウムブロミド等を含有する培地に1ml当たり約10菌体の密度で該宿主菌を接種し、その生育を不完全に阻害しながら約35℃で約24時間培養する。培養液を希釈して寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。得られたコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この一連の操作により、プラスミドpBY502が除去されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0016】上記操作により得られるプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株を前記プラスミドにより形質転換する方法としては、エシェリヒア・コリおよびエルビニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) について知られているように [Calvin, N.M. および Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. および Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA受容菌にパルス波を通電する方法 [Sato, Y. ら, Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照] 等を利用することができる。上記方法で形質転換して得られるsecE遺伝子産物産性能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地を用いて行うことができ、その際の炭素源として、例えばグルコース、エタノール、メタノールおよび蔗糖等を、そして窒素源として、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムおよび尿素等をそれぞ

れ単独で、もしくは混合して用いることができる。また、無機塩として、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等を用いることができる。この他にも、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等を栄養源として培地に添加してもよい。通常、培養は通気攪拌または振盪等の好気条件下に、約20~40℃、好ましくは約25℃~35℃の温度範囲で行う。培養中、培地のpHは5~10、好ましくは7~8付近に維持されることが望ましく、適当な酸又はアルカリを適宜培地に添加してpHを調整する。培養開始時における培地中の炭素源濃度は、好ましくは1~5重量%、更に好ましくは2~3重量%である。また、培養期間は通常1~7日間であるが、好ましくは2~5日間、最も好ましくは3日間である。かくして得られる培養物から遠心分離等により菌体を収集し、secE遺伝子産物を高率に含有する菌体を取得することができる。

【0017】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記実施例によりさらに具体的に説明する。

<実施例1>

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のsecE遺伝子DNAを含むDNA断片 (A断片) のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を、半合成培地であるA培地 [組成: 尿素 2 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg、MnSO<sub>4</sub> · 4~6H<sub>2</sub>O 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ビオチン 200 µg、塩酸チアミン 200 µg、グルコース 20 gを蒸留水に溶解して1 lとする] 1 l中で対数増殖期後期まで培養した後に菌体を回収した。得られた菌体を、リゾチームを10 mg/mlの濃度で含有する溶液 [組成: 10 mM NaCl、20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA · 2Na] 15 mlに懸濁した。該懸濁液にプロテナーゼKを100 µg/mlの最終濃度で添加し、これを37℃で1時間インキュベートした。次に、ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%となるように添加し、50℃で6時間インキュベートして溶菌させた。得られた溶菌液に等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加して室温で10分間穏やかに振盪した後、その全量を10~12℃で20分間、5,000×gの遠心分離に供し、その上清画分を分取した。該上清画分に酢酸ナトリウムをその濃度が0.3Mとなるように添加し、次いで2倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス

棒で搦め取り、これを70%エタノールで洗浄して風乾した。得られたDNAは、溶液〔組成：10mM トリス緩衝液 (pH7.5)、1mM EDTA・2Na〕5 mlを加えて4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0018】(B)組換えプラスミドpUC118-secEの創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液90μlを制限酵素EcoRI 50 unitsと37℃で1時間反応させて完全分解した。得られたDNA断片に、制限酵素EcoRIで切断した後に脱リン酸化処理したクローニングベクターpUC118(宝酒造社製)を混合した。この混合液に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>、およびT4DNAリガーゼ1 unitとなるように各成分を添加し、4℃で15時間反応させてDNA断片とベクターを結合させた。得られたプラスミド混液を用いて、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970 参照)によりエシェリヒア・コリJM109株(宝酒造社製)を形質転換し、アンピシリンを50mg含有する培地〔トリプトン10g、イーストエキストラクト5g、NaCl5gおよび寒天16gを蒸留水に溶解して1lとする〕に塗抹した。

【0019】この培地上に生育した株を常法により液体培養し、その培養液よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により切断し、得られた断片をアガロースゲル電気泳動に供した。泳動後、アガロースゲルよりDNAをナイロンメンブレンに移しとり、エシェリヒア・コリおよびバチルス・サブチルスにそれぞれ由来するsecE遺伝子に共通な領域をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。用いたプローブは、エシェリヒア・コリおよびバチルス・サブチルスに由来するsecE遺伝子から推定されるアミノ酸配列において特に相同性の高い領域に注目し、そ

のアミノ酸配列から想定された混合オリゴヌクレオチドプローブをアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製394 DNA/RNAシンセサイザーにより合成したプローブであった。実際に用いたプローブの塩基配列は、次のアミノ酸配列：

Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr

より想定される下記の塩基配列：

GAR GTI CGI AAR GTI ATY TGG CCI AC

(配列中、RはAまたはG、YはCまたはTを示し、ここでAはアデニン、Gはグアニン、Cはシトシン、Tはチミン、Iはデオキシイノシンを示す。)の26mer(塩基対)である。なお、プローブの合成にあたっては、デオキシイノシンを用いることで、混合の度合が著しく高くなることを回避した。

【0020】T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いて、合成した上記オリゴヌクレオチドプローブの5'末端リン酸基を[γ-<sup>32</sup>P]ATPによりラジオアイソトープラベルした[Analytical Biochemistry, 158, 307-315, 1986]。サザンハイブリダイゼーションは、常法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]に従い実施した。この結果、ラジオアイソトープでラベルされたポジティブなバンドを生ずるクローンが選定されたが、該クローンはプラスミドpUC118の大きさ3.2kbのDNA断片に加えて、大きさ約0.6kbの挿入断片を有することが認められた。この大きさ約0.6kbの挿入DNA断片を各種の制限酵素で切断して認められた制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは、前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また上記選定されたプラスミドを各種制限酵素で切断し、生じる切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第2表に示す。

【0021】

【表2】

第2表 プラスミドpUC118-secE

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BamHI	1	3.8
EcoRI	2	3.2, 0.6
PvuII	3	0.2, 0.8, 2.8

【0022】上記制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、pUC118-secEと命名した。

<実施例2>

secE遺伝子を含むDNA断片(A断片)の塩基配列の決定

実施例1(B)項で得られたsecE遺伝子DNAを含

む大きさ約0.6kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119(宝酒造社製)を用いたジデオキシヌクレオチド終止法(dideoxy chain termination 法)(Sanger, F.ら, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977)により、図2に示した戦略図に従って決定した。

【0023】<実施例3>

pUC118-secEプラスミドのエシエリヒア・コリsecE低温感受性変異株への導入

実施例1 (B) 項で得られたpUC118-secEプラスミドを用いて、エシエリヒア・コリのsecE低温感受性変異株であるPS163 (secEcs15)

[EMBO Journal, 10(No7), 1749-1757, 1991] を塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により形質転換し、これをアンピシリンを50 mg含有する寒天培地 [組成: トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 gおよび寒天 16 gを蒸留水に溶解して1 lとする] に塗抹し、20℃で培養した。A断片を挿入しない無処理のベクターのみをPS163株に導入した場合には20℃で培養して寒天培地上に生育する菌体は認められなかったのに対し、該株にpUC118-secEプラスミドを導入した場合には、DNA1 μg当たり10<sup>4</sup>個以上の形質転換体が得られた。この結果、該プラスミド中にsecE遺伝子が挿入され、かつ該遺伝子DNAが供試菌体内で機能することが確認された。

【0024】 <実施例4>

コリネ型細菌内で自律複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニス IF012144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載の方法に従い調製した。プレバクテリウム・スタチオニス IF012144 を、半合成培地A培地 [組成: 尿素 2 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub> 0.5 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6 mg、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カザミノ酸 5 g、ピチオン 200 μg、塩酸チアミン 200 μg、グルコース 20 gを蒸留水に溶解して1 lとする] 1 l中で対数増殖期後期まで培養した後、菌体を収集した。得られた菌体を、リゾチームを10 mg/mlの濃度で含有する緩衝液 [組成: 25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、10 mM EDTA、50 mM グルコース] 20 mlに懸濁して、37℃で1時間反応させた。この反応液にアルカリ-SDS液 [組成: 0.2 N NaOH、1% (W/V) SDS] 40 mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5 M 酢酸カリウム溶液 60 ml、酢酸1.1.5 ml、蒸留水28.5 mlの混合液] 30 mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0025】得られた溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離に供し、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液 (フェノール:クロロホルム=1:1混和液) を加えて

懸濁した後、再び全量を遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離に供して、その水層を回収した。得られた水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置した後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。得られた沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [組成: 10 mM トリス、1 mM EDTA; 塩酸にてpHを8.0に調整] 2 mlに溶解した。該溶解液に塩化セシウム溶液 [組成: 5倍濃度のTE緩衝液100 mlに塩化セシウム170 gを溶解した] 15 mlおよび10 mg/ml濃度のエチジウムブロマイド溶液1 mlを添加し、該液の密度を1.392 g/mlに調整した。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離に供した。

【0026】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方に位置するバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとり、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に、最終濃度が30 mMとなるように3 M 酢酸ナトリウム溶液を添加した後、2倍量のエタノールを添加し、-20℃で1時間静置した。該液を15,000×gで遠心分離してDNAを沈降させ、これを回収してプラスミドpBY503 50 μgを得た。

【0027】 (B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造社製) 0.5 μgと制限酵素SalI 5 unitsを37℃で1時間反応させて、プラスミドDNAを完全分解した。また、前記

(A) 項で調製したプラスミドpBY503 2 μgと制限酵素XhoI 1 unitを37℃で30分間反応させてプラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、その混合液を65℃で10分間加熱処理して液中の制限酵素を失活させた後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATPおよびT4 DNAリガーゼ 1 unitとなるように各成分を強化し、16℃で15時間インキュベートした。この溶液を用いてエシエリヒア・コリJM109コンピテントセル (宝酒造社製) を形質転換した。形質転換菌体を、各々最終濃度で30 μg/mlのカナマイシン、100 μg/mlのIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)、100 μg/mlのX-gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド) を含むL培地 [組成: トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、NaCl 5 gを蒸留水に溶解して1 lとする、pH 7.2] を用いて37℃で24時間培養した。

上記培地上に生育した生育株のうち、白いコロニーを形成して生育してきた株を選択し、各々の株からプラスミドをアルカリ-SDS法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular cloning (1982), 90-91 参照] により抽出した。以上の手順により、プラスミド p HSG 298 の SaI I 認識部位にプラスミド p BY 503 に由来する大きさ約 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド p HSG 298-ori が得られた。同様の方法を用いて、前記 (A) 項で得られたプラスミド p BY 503 を制限酵素 Kpn I 及び EcoR I で処理して得られる大きさ約 2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド p HSG 298-ori の Kpn I 及び EcoR I 認識部位にクローニングし、プラスミドベクター p CRY 30 を調製した。

#### 【0028】＜実施例5＞

##### プラスミド p CRY 30-sec E の調製およびコリネ型細菌への導入

実施例 1 (C) 項で得られたプラスミド p UC 118-sec E 5 µg を制限酵素 EcoR I 5 units と 37℃ で 1 時間反応させて得られたプラスミド分解物、ならびに実施例 3 (B) 項で得られたプラスミド p CRY 30 1 µg を制限酵素 EcoR I 1 unit と 37℃ で 1 時間反応させて得られたプラスミド分解物を混合した。この混合液に、それぞれの最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub>、T4 DNA リガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃ で 15 時間反応させて双方のプラスミド分解物を結合させた。得られた結合プラスミドを用い、前記方法に従ってエシェリヒア・コリ JM109 株を形質転換し、これをカナマイシンを 50 µg/ml 含む培地 [組成: トリプトン 10 g、イーストエキストラクト 5 g、NaCl 5 g および寒天 16 g を蒸留水に溶解して 1 l とする] に塗抹した。

【0029】この培地上に生育してきた株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出した。抽出プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド p CRY 30 の大きさ 8.6 kb の DNA 断片に加え、大きさ 0.6 kb の挿入 DNA 断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミド DNA を用いて、コリネ型細菌を形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて下記の如く行った。プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) のプラスミド p BY 502 除去株を前記 A 培地 100 ml 中で対数増殖期初期まで培養し、これにペニシリン G を最終濃度で 1 unit/ml となるように添加して、さらに 2 時間振盪培養した。培養物を遠心分離にかけて菌体を収集し、得られた菌体をパルス用溶液 [組成: 272 mM シュークロース、7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4] 20 ml にて洗浄した。洗浄後、再び遠心分離して菌体を収集し、この菌体を前記パルス用溶液 5 ml に懸濁した。該懸濁液 0.75 ml を前記手順により得たプラスミド DNA 溶液 50 µl と混合し、水中に 20 分間静置した後、ジーンパルサー (パイオラド社製) のパルス条件を 2500 ボルト、25 µFD に設定し、該装置により前記混合液にパルスを印加した。パルス加印後、この混合液を水中に 20 分間静置した。次いで、該液の全量を前記 A 培地 3 ml に移し、30℃ にて 1 時間培養した。さらに、培養菌体を最終濃度 15 µg/ml のカナマイシンを含有する前記 A 寒天培地に植菌し、30℃ で 2~3 日間培養した。前記実施例 3 (A) 項に記載の方法を用いて、出現したカナマイシン耐性株よりプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、その切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の第 3 表に示す。

#### 【0030】

##### 【表 3】

第 3 表 プラスミド p CRY 30-sec E

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>Sph I</u>	3	5.5, 2.1, 1.7
<u>EcoR I</u>	2	8.7, 0.6
<u>Pst I</u>	2	7.6, 1.7
<u>BamH I</u>	1	9.3
<u>Kpn I</u>	1	9.3

【0031】上記制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、p CRY 30-sec E と命名した。なお、プラスミド p CRY 30-sec E により形質転換されたプレビバクテリウム・フラバム MJ 233-sec E は、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成 5 年 3 月 9 日付

で受託番号: FERM P-13517 として寄託されている。

#### 【0032】

##### 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 150

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-150

特徴を決定した方法：E

#### 配列

GTG GGA GAA GTC CGT AAG GTT ATT TGG CCT ACT GCG CGC CAG ATG GTC ACG TACV  
al Gly Glu Val Arg Lys Val Ile Trp Pro Thr Ala Arg Gln Met Val Thr Tyr  
1 5 10 15  
ACC CTT GTG GTT TTG GGA TTT TTG ATT GTT TTG ACC GCT TTG GTG TCT GGT GTGT  
hr Leu Val Val Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Val Ser Gly Val  
20 25 30 35  
GAT TTC CTA GCT GGT CTT GGA GTT GAG AAG ATT CTG ACT CCG TAG  
Asp Phe Leu Ala Gly Leu Gly Val Glu Lys Ile Leu Thr Pro  
40 45 50

【図面の簡単な説明】

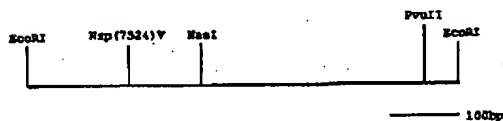
【図1】本発明で得られた secE 遺伝子 DNA を含む DNA 断片の制限酵素による切断点地図である。

【図2】本発明で得られた secE 遺伝子 DNA を含

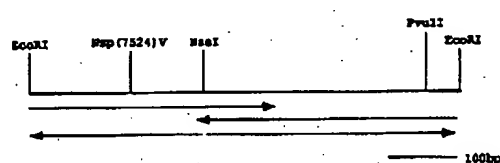
む、大きさ約 0.6 kb の DNA 断片の塩基配列を決定する戦略図である。

【図3】本発明で得られたプラスミド pCRY30-secE の制限酵素による切断点地図である。

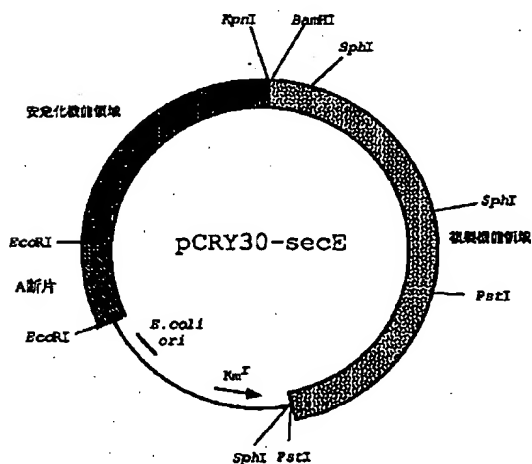
【図1】



【図2】



【図3】



Best Available Copy

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Best Available Copy